

COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE DOS VACUNAS ATENUADAS CONTRA LA BRUCELOSIS CAPRINA¹

D.V.M., M.P.H. GEORGE M. BAER²

M.V.Z. RICARDO FLORES C.³

M.V.Z. ADÁN CORTÉS N.³

M.V.Z. HÉCTOR MORALES S.⁴

Resumen

Se escogieron 53 cabras de raza Granadina de 12 y 15 meses de edad, primíparas y negativas a la prueba de aglutinación en placa y tubo. Un lote de 18 cabras fue vacunado con vacuna REV-1, 17 cabras fueron vacunadas con vacuna 899-B y las 18 cabras restantes fueron testigos sin vacunar. Un mes después de la vacunación las 53 cabras fueron llevadas al empadre y fueron expuestas con la cepa 53H38 de *Brucella melitensis*, 73 días después de vacunadas. Inmediatamente después del aborto o parto normal, todos los animales fueron sacrificados para hacer aislamientos a partir de ganglios linfáticos y órganos.

Los resultados de las pruebas de aglutinación señalan que los títulos producidos por la vacuna REV-1, fueron más altos y más estables que los producidos por la vacuna 899-B; los estudios bacteriológicos mostraron un mayor porcentaje de animales con infección generalizada en el lote 899-B. Los animales testigos mostraron mayor porcentaje de abortos y de infecciones generalizadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que la vacuna 899-B produjo una buena inmunidad: sin embargo, con la vacuna REV-1 se obtuvo mayor protección contra *melitensis*.

La *Brucella melitensis* fue descubierta en Malta en 1886. La infección por este germen ha sido un grave problema en muchas regiones del mundo. No se ha determinado aún la incidencia de Brucelosis en México, sin embargo algunos informes (Secretaría de Salud y Asistencia, 1947; Elizondo, 1955; Calvin, 1956; Ortiz, 1956; Cárdenas, 1969) muestran que la mayoría de los casos de Brucelosis en humanos, son causados por *B. melitensis*. Más de la mitad de estos casos, proceden de los estados en los que predominan las explotaciones caprinas (Ortiz, 1956; Cárdenas, 1969). Generalmente, el 38% de los rebaños de esas zonas se encuentran infectados. En muchos estados existe más del 10% de infección en cada rebaño; Cárdenas (1969) considera que la forma más efectiva para atacar este problema, radica en la vacunación de las cabras. Actualmente se realizan

numerosos intentos para elaborar una vacuna inocua, capaz de producir inmunidad suficiente y duradera.

Este trabajo tuvo por objeto evaluar la efectividad de dos vacunas atenuadas, contra la brucelosis caprina en México. La vacuna REV-1 (Elberg y Meyer, 1959) que fue probada en cabras por vez primera por Elberg y Faunce Jr. (1957) y posteriormente, en numerosas ocasiones, por Alton (1959, 1961, 1966, 1968) Elberg (1959) Jones, Thompson y Alton (1958) y Morgan *et al.* (1966); y la vacuna 899-B, desarrollada en México, probada primero en animales de laboratorio (León, 1966) y recientemente en cabras (León, 1970).

Material y métodos

Animales: Se emplearon 53 cabras hembras de raza Granadina, de 12 a 15 meses de edad, procedentes del Estado de Durango, las cuales, desde su nacimiento fueron mantenidas en estabulación. Todas resultaron negativas a las pruebas de aglutinación en placa para el diagnóstico de Brucelosis.

Un mes antes de ser apareadas, fueron vacunadas 18 cabras con la vacuna REV-1, en otras 17 se usó la vacuna 899-B y 18 cabras más se dejaron sin vacunar como controles. Cada animal se identificó por medio de una

Recibido para su publicación el 15 de abril de 1971.

¹ Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias de la S.A.G., Km. 15½ de la carretera México-Toluca, México. D. F., en cooperación con el Banco Nacional Agropecuario. Insurgentes Norte 423-15º piso, México, D. F.

² Consultor del Center of Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A. y de la Pan American Health Organization, Washington, D. C.

³ Departamento de Microbiología Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G.

⁴ Baneo Nacional Agropecuario.

marca de nitrógeno líquido. (Macpherson. 1967).

Vacunas: La vacuna REV-1.* elaborada a partir de una cepa mutante de *B. melitensis* que no requería la presencia de estreptomycina para su desarrollo, se aisló a partir de una población de *B. melitensis* que sí requería dicho antibiótico (Herzberg y Elberg. 1955). La vacuna se cultivó en un medio de tripticasa soya agar y se cosechó con solución de Zobell (Zobell y Zobell, 1932) se aplicó por vía subcutánea en el lado derecho del cuello de cada cabra 1 ml de suspensión bacteriana diluida en agua destilada estéril, a una concentración de 1×10^9 bacterias por ml.

La vacuna 899-B** elaborada con una cepa de *B. melitensis* lisa atenuada mediante 720 pases en medios de agar que contenían sales biliares (León, 1966). Se aplicó en la conjuntiva ocular derecha de cada cabra, una gota (1/28 ml) que contenía 7.5×10^{12} de bacterias diluidas en agua destilada estéril.

Pruebas de aglutinación. Las 53 cabras fueron sangradas 50 días antes y 52. 75. 80. 94. 106, 116, 126. 136 y 146 días después de la vacunación, con el fin de obtener suero sanguíneo para pruebas de aglutinación.

Las pruebas de aglutinación en tubo fueron realizadas utilizando antígeno estandarizado de *B. melitensis* (Cepa 16M) de acuerdo con el método recomendado por la O.M.S. (Alton y Jones, 1967). Las reacciones serológicas se consideraron positivas al encontrarse títulos de 1:40 o superiores.

Exposición. En la exposición de los animales, 73 días después de vacunados, se les aplicó, en la conjuntiva izquierda, una gota (previamente calibrada a 1/50 ml) de una suspensión de *B. melitensis* virulenta cepa 53H38. Cada gota contenía un título bacteriano de 4.03×10^3 lo cual se determinó inmediatamente después de la aplicación.

La exposición de todos los animales se efectuó en un período de 30 minutos. Primero se expuso un animal vacunado con 899-B. después uno vacunado con REV-1. por último

un animal del grupo control y así sucesivamente.

Obtención de muestras y pruebas bacteriológicas. Inmediatamente después de los abortos o partos, se colectaron los fetos y las placentas o se sacrificaron las crías y se hicieron cultivos bacteriológicos a partir del hígado, bazo, pulmón y contenido estomacal. Las hembras también fueron sacrificadas y de ellas se colectaron asépticamente los ganglios linfáticos submaxilares, parotídeos, retrofaríngeos, preescapulares, poplíteos, retromamarios, ilíacos, hepáticos y mediastínicos; además leche, sangre, exudado vaginal y fragmentos de pulmón, bazo, hígado, glándulas mamarias, carúnculas y placenta. Cada muestra fue inoculada en medio de Kuzdas y Morse (1953). Todas las colonias que crecieron en este medio, fueron teñidas con los colorantes de Gram y Hansen y fueron sembradas en medio de McConkey. Finalmente se hicieron pruebas de aglutinación con suero monoespecífico Anti-*B. melitensis*. Todas las colonias identificadas como gram negativas se tiñeron por la coloración de Hansen; no crecieron en medio de McConkey y presentaron aglutinación con antisuero monoespecífico. Todas las cepas de *B. melitensis* aisladas a partir de animales vacunados con REV-1, se cultivaron en dos medios, uno que contenía 2.5 mg de estreptomycina por ml de medio y en otro medio que contenía 5 U.I. de penicilina por ml. Esto se efectuó con el fin de determinar si la cepa aislada era REV-1 o cepa de exposición 53H38 (Alton y Jones. 1967). Las cepas aisladas a partir de animales vacunados con 899-B, se inocularon en ratones, los cuales fueron sacrificados 30 días después, con el fin de recuperar el germen, lo que permitió establecer la diferencia entre cepa vacunal y cepa de exposición (León. 1966).

Se consideró que las cabras tenían una infección generalizada cuando se encontraron seis o más tejidos infectados con *B. melitensis* cepa 53H38.

Resultados

Serología: Existió marcada diferencia entre los títulos de aglutinación de los animales del grupo control, y el de los vacunados (Cuadro 1). En el grupo vacunado con REV-1. el promedio del título fue de 1:77 a los 52

* Desarrollada y proporcionada por el Dr. S. S. Elberg, School of Public Health, University of California, Berkeley.

** Desarrollada y proporcionada por el Dr. Alberto P. León, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. Dirección de Investigaciones en Salud Pública, S.S.A.

días después de la vacunación y de 1:23 a los 126 días después de la misma o sean 53 días posteriores a la exposición. En las cabras vacunadas con 899-B, el título promedio de aglutinación a los 52 días fue de 1:13; y a

control, el número de crías y fetos infectados, fue elevado (9 de 19, que corresponde al 47.3%). En el grupo de animales vacunados con la 899-B, sólo algunas crías se infectaron (4 de 17 o sea el 23.6%); mientras

CUADRO 1

Títulos promedio de aglutinación ¹ de los grupos de cabras vacunadas con Rev-1, 899-B, y controles sin vacunar, después de ser expuestos con cepa 53H38 virulenta de *Brucella melitensis*

(Antígeno cepa 16 M)

Día después de la vacunación	Rev-1	899-B	Controles
52	1:77	1:13	1:10
73	Exposición	Exposición	Exposición
80 (7) ²	1: 38	1:14	< 1:10
94 (21)	1: 40	< 1:10	< 1:10
106 (33)	1: 53	< 1:10	< 1:10
116 (43)	1: 43	< 1:10	1:17
126 (53)	1: 23	< 1:10	1:27
136 (63)	1: 20	< 1:10	1:37
146 (73)	1: 28	< 1:10	1:57

¹ Se utilizó como antígeno la cepa 16 M. de *B. melitensis* para la prueba de aglutinación en tubo.

³ Los números entre paréntesis corresponden a los días siguientes a la exposición.

partir del 94° día. se mantuvo a un nivel inferior de 1:10. En el grupo control el título promedio fue menor de 1:10. hasta los 33 días después de la exposición, a los 43 días empezó a subir para terminar con 1:57 al final del experimento. Bacteriología: En el Cuadro 2, se exponen los números de fetos y crías sacrificados, a partir de las cuales se aisló *B. melitensis*. se incluye además el número de animales gestantes. En el grupo

que en el grupo de vacunados con REV-1, solamente se encontró un feto infectado (1 de 18. correspondiente al 5.5%). Inmediatamente después de que las cabras llegaron a los locales de aislamiento del I.N.I.P., ocurrieron muchos abortos los que se consideraron no específicos, ya que los animales fueron expuestos al día siguiente, por lo que es probable que el manejo fuera la causa de los mismos.

CUADRO 2

Número de abortos y nacimientos en los grupos de cabras vacunadas con Rev-1, 899-B y controles, expuestas con *Brucella melitensis* cepa 53H38

Vacuna	A b o r t o s			C r í a s		Abortos y nacimientos		
	Animales gestantes	Total	Causados por Brucela	Total	Infectadas con Brucela	Total	Asociados con Brucela %	
Rev-1	16	7 ^a	1	11	0	18 ^b	1/18	5.5
899-B	16	5	0	12	4	17	4/17	23.6
Controles	18	9	6	10	3	19 ^c	9/19	47.3

a) Seis de estos abortos probablemente se debieron al manejo.

b) Incluyendo dos parejas de gemelos.

c) Incluyendo una pareja de gemelos.

No fue posible reproducir las cepas de *B. melitensis* procedentes de animales vacunados con REV-1, en medios que contenían estreptomycinina, lográndose colectar de aquellos que tenían penicilina por lo que se concluyó, que se trataba de la cepa de exposición.

De los ratones inoculados con cepas aisladas a partir de las cabras vacunadas con 899-B, se aisló *B. melitensis* por lo que fue posible considerarla como cepa de exposición.

En los Cuadros 3 y 4 están resumidos los datos referentes al grado de infección de las

cabras adultas, sacrificadas después del aborto o el parto y el tiempo transcurrido entre la fecha de exposición y la fecha en que se realizó la necropsia. El grado de infección fue muy similar entre las cabras del grupo vacunado con 899-B y las cabras del grupo control (70.6% y 77.7% respectivamente), mientras que en el grupo de animales vacunados con REV-1 el grado de infección fue considerablemente menor (33.3%). Las cabras del grupo control presentaron el número mayor de órganos infectados (Cuadros 4 y 5).

CUADRO 3

Infección por Brucela en los grupos de cabras vacunadas con Rev-1, 899-B y controles expuestos con *Brucella melitensis* cepa 53H38

Vacuna grupo	Número de animales	Cabras infectadas con Brucela	Cabras no infectadas	Núm. total de animales infectados %	
Rev-1	18	6	12	6/18	33.3
899-B	17	12	5	12/17	70.6
Controles	18	14	4	14/18	77.7

Rev. 1 vs 899-B ($\chi^2_6 = 6.218$ vs $\chi^2_{0.05} = 3.84$, G. L. = 1)
899-B vs Controles ($\chi^2_t = 3.378$ vs $\chi^2_{0.05} = 3.84$, G. L. = 1)

CUADRO 4

Número de órganos infectados en los grupos de cabras vacunadas con Rev-1, 899-B y el grupo control, expuestos con *B. melitensis* cepa 53H38

Vacuna Rev-1		Vacuna 899-B		Controles	
25 ¹	0 ²	25 ¹	4 ²	25 ¹	0 ²
27	0 ^a	30	0	38	1
48	0	39	11	39A	19
55	1	48	1	39A	26
59A ^b	23	56	2	40A	11
60	0	59	0	41	0
62	5	60K ^c	21	48	1
67	0	67	0	55	0
73	0	68	4	55K	16
73	11	68	4	55	6
77	0	68	1	60A	19
83	2	71	0	71A	13
91	2	73K	2	73K	8
95	0	73	1	77A	21
95	0	73KK	7	77K	18
102	0	91	4	95	2
102	0	102	0	96	2
102	0			102	0

¹ Días transcurridos entre exposición y sacrificio.

² Órganos infectados.

A: Abortó.

a: No se aisló Brucela.

b: Se aisló *Brucella melitensis* a partir de fetos abortados.

c: Se aisló *Brucella melitensis* a partir de las crías.

K: Cria.

KK: Gemelos.

Al estudiar la leche y el exudado vaginal, se aisló *B. melitensis* en 7 de 14 cabras controles infectadas; mientras que fue imposible aislar este germen, en las cabras vacunadas. Se aisló cepa REV-1 a partir del hígado de la primera cabra sacrificada en el grupo correspondiente.

Se observó escasa relación entre la presencia de *B. melitensis* en los tejidos de las cabras y la existencia de títulos positivos (1:40) de aglutinación en tubo (Cuadro 6). Solamente una cabra vacunada con REV-1. que

por *B. melitensis*, parece ser que la vacuna REV-1 reúne las mejores cualidades. Esta vacuna confiere buena inmunidad a los caprinos (Alton, 1959, 1961, 1966 y 1968; Elberg, 1959; Jones, Thompson y Alton, 1958; Morgan *et al.* 1966) y a los ovinos (Entessar *et al.*, 1967; Jones, Entessar y Ardalan, 1964; Orlov. Ulasevich e Ivanov, 1965) los cuales resisten la infección con fuertes dosis de exposición y la inmunidad conferida dura por lo menos 4 y 1/2 años (Alton, 1968). En ocasiones, los animales vacunados excretan el germen vacu-

CUADRO 5

Severidad de infección por Brúcela entre los grupos de cabras vacunadas con 899-B Kev-1 y un grupo control, expuestas con *Brucella melitensis* cepa 53H38

	V a c u n a d a s c o n :		
	Rev-1	899-B	Controles
Cabras infectadas	6/18	12/17	14/18
Cabras con infección generalizada*	2/18	3/17	10/18

* Se consideró al animal con infección generalizada cuando se le encontraron seis o más órganos infectados.

CUADRO 6

Relación entre los títulos finales de aglutinación en tubo (1:40 o mayores) y la presencia de *Brucella melitensis* en el estudio post-mortem, de cabras expuestas después de haber sido vacunadas con Kev-1, 899-B y un grupo control

Tipo de vacuna	Cultivos positivos de <i>B. melitensis</i> en cabras con títulos		Cultivos negativos de <i>B. melitensis</i> en cabras con títulos	
	Igual o superior a 1:40	Menor a 1:40	Igual o superior a 1:40	Menor a 1:40
Rev-1	4	2	12	0
899-B	1	10	2	5
Controles	9	4	1	4

presentó *Brucella* en sus tejidos, tenía títulos bajos de aglutinación, mientras que en 12 cabras de este mismo grupo, con títulos de 1:40 o superiores, no fue posible aislar el germen. En los animales vacunados con 899-B, sucedió lo contrario, ya que en 10 cabras con títulos finales menores de 1:40, se aisló *Brucella* de sus tejidos y solamente dos animales de este grupo que presentaron títulos iguales o superiores a 1:40, fueron negativos al aislamiento del germen.

Discusión

De todas las vacunas producidas hasta ahora para inmunizar cabras contra la infección

nal en la leche (Alton, 1967) lo cual podría ser un problema para el consumo humano. Al aplicarse la vacuna en animales que se encuentran en cierta fase del período de gestación se produce aborto (Elberg y Meyer, 1958). Aparentemente estos factores no causan diseminación de la cepa entre los animales (Neeman, 1968), ni producen reversión de ésta a una mayor virulencia aun bajo las condiciones más severas (Alton, Elberg y Dorothy Crouch, 1967; Elberg y Faunce Jr. 1962). La eficacia de la vacuna REV-1 para proteger cabras contra infecciones de *B. melitensis*, ha sido estudiada en muchas partes del mundo, pero esto no se había realizado en América Latina, con excepción

de algunas pruebas de campo, muy limitadas, que se efectuaron en Argentina (Szyfres *et al.*, 1962). Las pruebas descritas en este artículo agregan a las evidencias ya existentes, datos importantes sobre la eficacia de la vacuna REV-1 en cabras.

Recientemente León (1970) demostró que la vacuna 899-D. es inocua en cabras y protege por lo menos durante dos años. Además, informó que las hembras gestantes pueden vacunarse hasta 15 días antes del parto sin presentar aborto, pero los gérmenes pueden ser eliminados en la leche. Sin embargo, es necesario realizar más estudios al respecto para poder obtener mejores conclusiones, ya que el número de animales utilizados en estudios anteriores no permiten hacer comparaciones estadísticas. Los resultados ante la exposición, en los tres experimentos de la vacuna 899-B notificados hasta ahora, se interpretaron de acuerdo a las reacciones serológicas y no se realizaron estudios bacteriológicos.

En nuestro trabajo, la vacuna REV-1, mostró ser la más efectiva para disminuir del número de abortos e infecciones en crías recién nacidas. La vacuna 899-B. redujo también el grado de infección en abortos y crías pero en menor proporción. Se observó menor excreción del agente patógeno en leche y exudado vaginal utilizando estas dos vacunas.

El análisis de los resultados mediante la prueba de χ^2 , no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con respecto a infección entre los animales vacunados con 899-B y los animales controles; mientras que los resultados de las cabras vacunadas con REV-1 mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$). Por lo tanto, la vacuna REV-1 confirió mejor protección contra la infección artificial por *B. melitensis*, con dosis de exposición que infectó a 14 de 18 animales controles. Además, disminuyó considerablemente el número de abortos y crías infectadas. Estos resultados se comparan favorablemente con otros citados anteriormente. (Alton, 1959, 1961, 1966; Elberg, 1959; Jones, Thompson y Alton, 1958.)

León y Cano (1958) emplearon una porción de polisacárido de *B. melitensis* adsorbida en hidróxido de aluminio y concluyeron que la infección por *B. melitensis*, se encuentra invariablemente acompañada de un aumento en los títulos de las reacciones de aglu-

tinación con la consiguiente conversión serológica de negativos a positivos, debido tanto a la vacunación como a la infección previa. Nosotros no encontramos esta relación, puesto que la mayoría de cabras vacunadas con 899-B, que se infectaron con la cepa de exposición, presentaron títulos menores de 1:40 y solamente dos cabras de este grupo libres del germen, tuvieron reacciones de aglutinación mayores a éstos. En contraste, en el grupo de cabras vacunadas con REV-1. la mayoría de los animales se encontraron libres de la cepa de exposición y tuvieron títulos de aglutinación iguales a 1:40 o superiores, mientras que solamente en dos de las cabras infectadas con dicha cepa, se observaron reacciones inferiores a 1:40.

Definitivamente los resultados serológicos no son suficientes como criterio único al juzgar el estado de infección de un animal, puesto que es factible que animales que sufren un aumento en los títulos de aglutinación sean negativos a la infección, mientras que otros que no tienen elevación en dichos títulos, pueden estar infectados.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los doctores S. S. Elberg, Lois M. Jones y G. G. Alton, por su cooperación en la planeación, y al doctor R. Santibáñez por la revisión de este trabajo.

Summary

Fifty three granadine goats, 12 to 15 months old, primiparous, negative to both plate and tube agglutination tests, were divided in three groups: 18 goats received Rev-1 vaccine subcutaneously, 17 goats received 899-B vaccine by conjunctival route and 18 goats were used as non vaccinated controls.

One month after vaccination, all the goats were bred. They were challenged with the 53H38 *B. melitensis* strain 73 days after vaccination. They were slaughtered just after abortion or normal parturition and the isolation of the microorganism was attempted from viscera and lymphatic nodes. Agglutination titers in Rev-1 vaccinated group were higher and more stable than those of 899-B group, which presented a higher incidence

of animals with generalized infection, as shown by the bacteriological studies. The control group presented a higher incidence of abortion and generalized infection.

Good immunity was produced with the 899-E vaccine. However, Rev-1 vaccine gave better results concerning the protection against *B. melitensis*.

Literatura citada

- ALTON, G. G. 1959. *Brucellosis in Malta II. Trials with a living attenuated B. melitensis in vaccine in goats*. Br. Vet. J. 115: 251-260.
- ALTON, G. G. 1961. *A comparison under natural conditions of two vaccines for the immunization of goats against B. melitensis infection*. Res. Vet. Sci. 2: 232-239.
- ALTON, G. G. 1966. *Duration of the immunity produced in goats by the REV-1 Brucella melitensis vaccine*. J. Comp. Path. 76: 241-253.
- ALTON, G. G. and Lois M. JONES. 1967. *Lab. Techniques in Brucellosis*. World Health Organization; Monograph Series N° 55.
- ALTON, G. G. and S. S. ELBERG. 1967. *REV-1 Brucella melitensis vaccine. A review of ten years of study*. The Vet. Bulletin, 37: 793-800.
- ALTON, G. G., S. S. ELBERG and DOROTHY CROUCH. 1967. *REV-1 Brucella melitensis vaccine. The stability of the degree of attenuation*. J. Comp. Path. 77: 293-300.
- ALTON, G. G. 1968. *Further studies on the duration of immunity produced in goats by the REV-1 B. melitensis vaccine*. J. Comp. Path. 78: 173-178.
- CÁRDENAS, L. J. 1969. *Vigilancia epidemiológica de las zoonosis en la frontera norte de México*. Salud Pública de México. 11: 635-639.
- ELBERG, S. S. and K. FAUNCE, JR. 1957. *Immunization against brucella infection VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of Brucella melitensis*. J. Bact. 73: 211-217.
- ELBERG, S. S. and K. F. MEYER. 1958. *Caprine immunization against brucellosis. A summary of experiments on the isolation properties and behavior of a vaccine strain*. Bull. Wld. Hlth. Org., 19: 711-724.
- ELBERG, S. S. 1959. *Immunization against brucella infection VII. Immunological and epidemiological studies in Córdoba, Spain*. Bull. Wld. Hlth. Org. 20: 1033-1051.
- ELBERG, S. S. and W. K. FAUNCE, JR. 1962. *Immunization against brucella infection VIII. The response of Cynomolgus philippinensis, guinea pigs and pregnant goats to infection by the REV-1 strain of Brucella melitensis*. Bull. Wld. Hlth. Org. 26: 421-436.
- ELIZONDO, L. A. 1955. *Brote epidémico de brucelosis consecutiva a epizootia caprina, en la Comarca Lagunera*. IX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Higiene.
- ENTESSAR, F., A. ARDALAN, A. EBADI and Lois M. JONES. 1967. *Effect of living REV-1 vaccine, in producing long-term immunity against Brucella melitensis infection in sheep in Iran*. J. Comp. Path. 77: 367-376.
- GALVÁN, C. S. 1956. *Brote de brucelosis en el rancho La Cueva del municipio de Apasco el Alto, Gto.* Bol. Epidem. 20: 86-91.
- HERZBERG, M. and S. S. ELBERG. 1955. *Immunization against brucella infection. III. Response of mice and guinea pigs to injection of viable and non-viable suspensions of a streptomycin dependent mutant of B. melitensis*. J. Bact. 69: 432-435.
- JONES, Lois M., F. ENTESSAR and A. ARDALAN. 1964. *Comparison of living vaccines in producing immunity against natural Brucella melitensis infection in sheep and goats in Iran*. J. Comp. Path. 74: 17-30.
- JONES, Lois M., P. D. TOMPSON and G. G. ALTON. 1958. *Production of immunity against experimental B. melitensis infection in goats*. J. Comp. Path. 68: 275-287.
- KUZDAS, C. D. and E. V. MORSE. 1953. *A selective medium for the isolation of brucellae from contaminated materials*. J. Bact. 66: 502-504.
- LEÓN, A. P. y CARMEN CANO. 1958. *Antígeno artificial antibrucella preparado con un polisacárido aislado de Brucella melitensis por biodiálisis. Sus propiedades inmunológicas*. Rev. Inst. Salubridad y Enfermedades Trop., XVIII. (2): 45-61.
- LEÓN, A. P. 1966. *Inmunización contra la Brucella melitensis con la cepa viva de virulencia atenuada*. Rev. Inst. Sal. Públ. (México). 26: 215-234.
- LEÓN, A. P. 1970. *Vacuna viva cepa 899-B anti Brucella melitensis para inmunización de cabras*. Memorias del X Congreso Internacional de Microbiología, México, D. F., p. 88.
- MACPHERSON, J. W. and P. PENNER. 1967. *Animal identification. I. Liquid nitrogen branding of cattle. II. Freeze branding of seals for laboratory identification*. Can. J. Comp. Med. 31: 271-274 & 275-276.
- MORGAN, W. J. B., A. I. LITTLEJOHN, D. J. MACKINNON and J. R. LAWSON. 1966. *The degree of protection given by living vaccines against experimental infection with B. melitensis in goats*. Bull. Wld. Hlth. Org. 34: 33-40.

- NEEMAN, L. 1968. *The safety of the REV-1 strain of Brucella melitensis for pregnant sheep by natural contad.* Refuah Vet. 25: 265-269.
- ORLOV, E. S., P. S. ULASEVICH and M. M. IVANOV 1965. *Study of immunity intensity in sheep vaccinated with vaccines from strains Brucella abortus 19 and Brucella melitensis REV-1.* Trudy vses. Inst. eksp. Vet. 31: 3-7.
- ORTIZ, M. C. 1956. *Brucelosis. Algunos aspectos de la epidemiología en México.* Bol. Epidem. México, 20: 113-125.
- Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1947. *Estudios de la brucelosis en la República Mexicana.* Salubridad y Asistencia. México, 7: 611-633.
- SZYFRES, B., B. D. BLOOD, V. C. F. CEDRO and R. M. MENDY. 1962. *Field trial of a living attenuated vaccine for caprine brucellosis.* Zoonoses Res. 1: 145-153.
- ZOBELL, C. E. and M. H. ZOBELL. 1932. *Metabolism studies in the brucela group. III. Viability in aqueous solutions.* J. Inf. Dis. 50: 538-541.